

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 043 075
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 81104827.1

(51) Int. Cl.³: C 12 N 15/00

C 12 P 21/00, C 12 N 9/86

(22) Anmeldetag: 23.06.81

C 12 N 9/36, C 12 N 9/12

(30) Priorität: 25.06.80 DE 3023787

(71) Anmelder: Studiengesellschaft Kohle mbH
Kaiser-Wilhelm-Platz 1
D-4330 Mülheim/Ruhr(DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
06.01.82 Patentblatt 82/1

(72) Erfinder: Nicolau, Yves-Claude, Prof. Dr.
Leonhard-Stinnes-Strasse 48
D-4330 Mülheim/Ruhr(DE)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(72) Erfinder: Sené, Claude, Dr.
Jahnstrasse 3
Mülheim/Ruhr(DE)

(74) Vertreter: von Kreisler, Alek, Dipl.-Chem. et al,
Deichmannhaus am Hauptbahnhof
D-5000 Köln 1(DE)

(54) Verfahren zur Erhöhung der Inkorporation und der Expression von genetischem Material in die Kerne von intakten Zellen mit Hilfe von Liposomen.

(57) Ein Verfahren zur Erhöhung der Aufnahme und der Expression von genetischem Material in die Kerne von intakten Zellen ist dadurch gekennzeichnet, daß man mit genetischem Material beladene Endozytose-Liposome durch Endozytose in die Zellkerne einführt.

EP 0 043 075 A2

Verfahren zur Erhöhung der Inkorporation und der Expression von genetischem Material in die Kerne von intakten Zellen mit Hilfe von Liposomen

Liposomen wurden benutzt, um genetisches Material in Zellen einzubauen (Poste, G., und Papahadjopoulos, D; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976) 73, 1603-1607; Weissmann, G. Bloemgarden, D., Kaplan, R., Hoffstein, S., Collins, T., Gotlieb, A. und Nagle, D.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1975) 72, 88 - 92; Poste, G., Papahadjopoulos, D., und Vail, W.J., (1976) Methods in Cell Biology ed. Prescott, D. Academ. Press, New York, vol. XIV, 33 - 71; Gregoradis, G., (1974) in Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases, eds. Tager J.M., Hooghinkel G.J.M., und Daems, W.Th. (North Holland) Amsterdam pp. 131 - 148).

In der Patentanmeldung P 29 42 780.3 wurde die Inkorporation des bla-Gens in verschiedenen eukaryoten Zellen und dessen Expression vorgeschlagen. Dort wurde die Inkorporation eines Restriktionsfragments aus dem Plasmid pBR 322 in verschiedene Zellen (Hela, LM, Human-Lymphocyten, Human-Hepatozyten, Hühner, Embryofibroblasten) mit Hilfe von DNS-beladenen Liposomen beschrieben. Die erzielte DNS-Inkorporation in den aufgezählten Zellen erreichte 2,5 % des Ausgangsmaterials, d.h. maximal 2000 Genkopien pro Zelle. Die Genaufnahme im Kern der Wirtszellen erreichte maximal 37 % dieser Zahl.

Die vorliegende Erfindung stellt sich die Aufgabe, die Genaufnahme in den Zellkernen und das Niveau der Expression signifikant zu erhöhen. Darüber hinaus soll ein Gen-Dosierungseffekt bewirkt werden, der auch mit Hilfe der Liposomen

- 2 -

zustande gebracht werden kann. Die Erfindung betrifft die in den Ansprüchen dargelegten Gegenstände. Das erfindungsgemäße Verfahren wurde mit folgenden Genen durchgeführt:

- 1.) Restriktionsfragmente des bla-Gens aus dem Plasmid
5 pBR 322 E-coli
(Sutcliffe, I.G.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1978)
75 3737 - 3741)
- 2.) Das gesamte pBR 322 E-coli Plasmid
10 (Fraley R.T.; Fornari, C.S. und Kaplan, S. Proc. Nat.
Acad. Sci. USA (1979) 76 3348 - 3352
- 3.) Das Kaninchen B-Globin Gen in pBR 322 Plasmid
(Maniatis, T.; Kee, S.G., Efstratiadis, A. und
Kafatos, F.C. (1976) Cell 8 163 - 182)
- 4.) Die Lysozym c-DNA im gesamten pBR Plasmid
15 (Sippel, A.E.; Land, H.; Lindenmaier, W.; Minhchi
Nguyen-HUU, MC.; Wurtz, T.; Timmth, K.N.; Giesecke,
K.; Schütz, G.;
Nucleic Acid Research (1978) 5 3275 - 3298)
- 5.) Das Conalbumin-Gen im pBR 322 Plasmid
20 (Wasylky, B.; Kedinger, C.; Cordén, I.; Brison, O &;
Chambon, P.; (1980) Nature 285 367 - 373)
- 6.) Das Thymidinkinase-Gen im pBR 322 Plasmid
25 (Colbere-Garapin, F.; Choustermon, S.; Horodniceau, F.;
Kourilsky, P.; Garapin, A.C.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA
(1979) 76 3755 - 3759)
- 7.) Das SV 40 Virus
(Goff, S.P.; Berg, P.; Cell. 9, 695 - 705 (1976))

8.) Das genomiale Interferon-Gen in pBR 322 Plasmid
(Nagata, S.; Taira, H.; Hall, A.; Johnsrud, L.;
Streuli, M.; Escodi, J.; Boll, W.; Cantell, K.;
Weissmann, C.; Nature (1980) 284, 316 - 320)

5 9.) Die c-DNA des Interferons im Plasmid
(vergl. 8.))

10.) Das Insulin-Gen im Plasmid pBR 322
(Seeburg, P.H.; Shine, J.; Martial, I.A.; Ivarie, R.D.;
Morris, I.A.; Ullrich, A.; Baxter, J.D.; Goodman, H.M.;
10 (1978) Nature 276 795 - 798)

Es ist bekannt, daß fluide, elektrisch geladene Liposomen hauptsächlich durch Fusion in Kulturzellen dringen, während fluide, neutrale oder feste, elektrisch geladene Liposomen durch Endozytose in Kulturzellen eindringen. Während der
15 Fusion gleichzeitig mit der Verschmelzung der äußeren Lipidschichten von zwei Membranen findet auch die Entladung des eingeschlossenen Materials statt. Bei der Endozytose von Liposomen durch Zellen werden die Vesikel als intakte Strukturen von den Zellen aufgenommen und im Inneren der Zellen
20 erst durch Wechselwirkungen mit den lysozomalen Enzymen geöffnet. Das Zell-Zytoplasma ist reich an DNAsen. Die DNS-Moleküle, die durch die Fusion von DNS-beladenen Liposomen mit den Zellen in das Zytoplasma gelangen, werden in großem Ausmaß der Einwirkung dieser DNAsen ausgesetzt.
25 Sollten aber die DNS-Moleküle nach ihrem Eindringen in die Zellen mindestens eine Zeitlang geschützt werden, würde sich die Wahrscheinlichkeit erhöhen, daß eine größere Zahl solcher Moleküle den Zellkern erreichen.

Dieses kann erfindungsgemäß durch die Verwendung von
30 Endozytose Liposomen erreicht werden. Weiterhin wurde jetzt

gefunden, daß die Zahl der DNS-Moleküle, die in den Zellkern aufgenommen werden kann, auch vom Zustand des Kerns abhängt. In der mitotischen Phase des Zellzyklus ist der Kern von keiner Membran umgeben; gleichzeitig finden in 5 der mitotischen Phase die meisten "Genrearrangements" statt.

Erfindungsgemäß wurden die Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen synchronisiert und die Aufnahme des fremden genetischen Materials in die Zellkerne bestimmt. Weiterhin wurden erfindungsgemäß verschiedene Konzentrationen von 10 Genmaterial in die Zellen eingebaut und die dabei ablaufende Proteinproduktion analytisch bestimmt. Dies erlaubte die Beobachtung, daß im Konzentrationsbereich 200 - 1200 Genmoleküle/Zelle ein starker Anstieg der Proteinproduktion stattfindet; zwischen 1200 und 2000 Genmolekülen/Zelle 15 wird diese Produktion für die untersuchten Zellen weitgehend konstant.

Beispiel 1

a) Zellen: Die folgenden Zellen wurden verwendet: Hela, Human DG 75 Lymphozyten, Maus LMTK⁻, Hühner-Embryofibroblasten, 20 Human-Knochenmarkzellen, Detroit 6 BHK 21 Hamsterzellen, Human-Hepatozyten und Human WI-38 Fibroblasten. Die Zellen wurden in üblicher Weise, z.B. wie in der oben zitierten Literatur beschrieben, kultiviert.

b) Genetisches Material

25 1. bla-Gen
2. Plasmid pBR 322 von E. coli
3. Plasmid pBR 322 von E.coli mit dem Kaninchen- β -globin-
Gen
4. Das Gen des Hühner-Conalbumin im Plasmid
30 5. Das C-DNA des Hühner-Lysozym auch im Plasmid.

Inkorporation der Gene in Liposome

Für das Einschließen großer DNS-Moleküle als ganze Plasmide in Liposome wurde eine Injektionsmethode (Lurquin, P.F., 1979) Nucleic Acid. Res. 6, 3773-3784) benutzt. Mit dieser

5 Methode wurde eine Ätherlösung der gewünschten Lipide gleichmäßig in eine auf 60°C erwärmte DNS-Lösung eingespritzt. Es bilden sich große Vesikel, die die DNS-Moleküle einschließen. Zwei Klassen solcher Vesikel wurden hergestellt:

1. Endozytose-Liposome, bestehend aus Phosphatidylcholin aus 10 Eigelb (PC)
2. Fusion-Liposome, bestehend aus PC und geladenen Lipiden, wie: Phosphatidyl-serin, Phosphatidsäure, Stearylamin.

Die Lipidzusammensetzung der Liposome hängt immer auch von der Lipidzusammensetzung der Zellmembrane ab, mit der die 15 Wechselwirkung stattfinden sollte.

Die erhaltenen Liposome, mit DNS beladen, wurden anschließend 30 Minuten mit 50 µg/ml DNase I bei 37°C inkubiert, um die nicht eingeschlossenen Moleküle zu hydrolysern. Eine Gel-filtration auf Sepharose/4B zeigte dann, daß allein die 20 eingeschlossene DNS intakt geblieben war.

Die benutzten Lipidkonzentrationen, um DNS-beladene Liposome zu erhalten, variierten von 1,4 µg/ml bis zu 7 mg/ml je nach Zahl der Zellen, die inkubiert werden sollten und nach dem Konzentrationsverhältnis DNS : Lipide. Das Ergebnis zeigt 25 überraschend, daß sehr große DNS-Moleküle (bis zum Molekulargewicht von 18×10^6 Dalton, aber auch darüber hinaus) als intaktes genetisches Material in Liposome eingeschlossen werden können.

- 6 -

Zell-Liposom Wechselwirkung

Die DNA-beladenen Liposome werden mit Hela-Zellen, Hühnerembryozellen, WI-38 Human-Fibroblasten, Hepatozyten (human) oder Lymphozyten inkubiert. Ehe 4 ml der Liposom-Suspension
5 zu 10^7 Zellen zugegeben werden, werden die Zellen mit 20ml DMEM ohne Serum gewaschen. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C wurde die Liposom-Suspension dekantiert und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, bevor das serumfreie DMEM zugesetzt wurde. Um nicht eingeschlossene DNA, die an
10 der Zelloberfläche adsorbiert ist, zu entfernen, werden die Zellen mit DNase I behandelt. Nach Entfernen der Liposom-Suspension durch Wäsche werden aliquote Teile der Zellen mit 4 ml einer DNase I-Lösung (50 µg/ml in PBS mit 10 mM MgCl₂) versetzt, vermischt und die Mischung während 30 Minuten
15 inkubiert.

Extraktion der Zell-Nuklearsäuren

Nach Inkubation wurden die Zellen mit Phosphatbufferdsaline (PBS) gewaschen, trypsinisiert und pelletiert durch Zentrifugation. Die Zellen wurden im RBS-Puffer suspendiert
20 (10 mMol NaCl, 10 mMol Tris.HCl pH = 7,5, 1,5 mMol MgCl₂) und 1 % Triton x-100 hinzugefügt. Die Zellen wurden durch Homogenisation in einem Dounce-Homogenisator lysiert. Die Zellkerne wurden durch 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 Ud/N pelletiert und zweimal mit dem RBS-Puffer gewaschen. Die
25 Lyse der Zellen wurde in Anwesenheit von 300 µg/ml kalter DNS durchgeführt.

Durch die Behandlung der Zellen mit 2 % Na-dodecylsulfat in 0,1 M Tris.HCl, pH = 9,0, 0,2 n NaCl, und 1-stündiger Inkubation mit 100 mg/ml Proteinase K bei 37°C wurden die totalen
30 DNS-Extrakte erhalten. Die Entfernung der Proteine erfolgte durch zweimaliges Mischen mit Phenol. Die DNS wurde mit CCl₄CO₂H prezipitiert, auf GF/C Glasfaserfilter aufgetragen und mit 5 % Trichloressigsäure (TCA) und 95 + Äthanol gewaschen.

Synchronisierung der Zellen

Die Zellen wurden, wie von Senè, C. et al (FEBS Lett. 88, 187 - 191, 1978) beschrieben, durch Thymidinblock synchronisiert.

5 Bestimmung des Genproduktes

a) β -Lactamase (bla) wie beschrieben von O' Callaghan, C.H. Morris, A. Kirby, S.M., and Shingler, A.H. (1972) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1, 283 - 288.

10 b) β -Globin, beschrieben von Ostro et al (Nature 274, 921-923, 1978).

Ergebnisse

Tabelle I zeigt die Aufnahme der 32 P-DNS in Hela-Zellen im exponentiellen Wachstum. Die Inhibition der Endozytose mit 50 μ g/Cytochalasin B führt zu einer starken Abnahme der Zahl 15 der 32 P-DNS-Moleküle, die in den zellulären Kern-DNS aufgenommen werden, wenn die Zellen mit Endozytoseliposomen behandelt worden sind. Wenn elektrisch geladene Liposome benutzt werden, d.h. Liposome, die in der Lage sind, sowohl durch Fusion wie auch durch Endozytose in die Zellen einzudringen, 20 dann ist diese Abnahme wesentlich kleiner. Die Behandlung mit Cytochalasin B inhibiert zu 85 % die DNS-Aufnahme durch Endozytose der DNS-beladenen, neutralen Liposome (PC) aber nur zu 36 % diese Aufnahme, wenn elektrisch geladene Liposome benutzt werden. Nicht nur die Aufnahme der 32 P-DNS durch 25 Endozytose der PC-Liposome ist höher, sondern auch die Expression des Genproduktes ist intensiver, wenn diese Liposome benutzt worden sind (Fig. 1). In dem Kontrollversuch wurden Hela-Zellen verwendet, welche nur leere Liposomen aufgenommen hatten. Die Reaktion mit Cephalosporin führt in diesem Fall 30 zu keiner Absorptionsbande bei 510 nm. Die Hela-Zellen, welche das bla-Gen durch die Endozytose von PC-Liposomen aufgenommen haben, zeigen nach Reaktion mit Cephalosporin eine starke Absorption bei 510 nm (OD = 0.60). Die Zellen, die elektrisch

geladene, d.h. Fusionsliposome aufgenommen haben, exprimieren das Gen auch, aber beträchtlich schwächer ($OD = 0.30$). Wenn Endozytose-Liposome benutzt werden, aber die Endozytose durch Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B gehemmt wurde,
5 ist die Expression des Gens sehr gering ($OD = 0.12$). Eine Gen-Dosierung erscheint also möglich: Wenn man verschiedene Gen-Konzentrationen in die Zellen einschleust und die Expression des Gens in Form von Proteinkonzentration oder enzymatischer Aktivität bestimmt, erhält man die Kurve von Fig. 2.

10 Eine recht starke Zunahme des Genproduktes wird beobachtet, wenn 200 bis etwa 1200 Genkopien pro Zelle eingebaut werden. Über 1200 Genkopien pro Zelle bewirken praktisch keine Erhöhung der Proteinproduktion mehr.

15 Die Proteinproduktion wurde über 40 Zellgenerationen verfolgt. Sie zeigt keine signifikanten Schwankungen, ist also konstant, und das Zellwachstum ist unbeeinträchtigt. Dadurch erhält man die Möglichkeit, bestimmte Proteine von eukaryotischen Zellen in vorauskalkulierbaren Mengen zu produzieren.

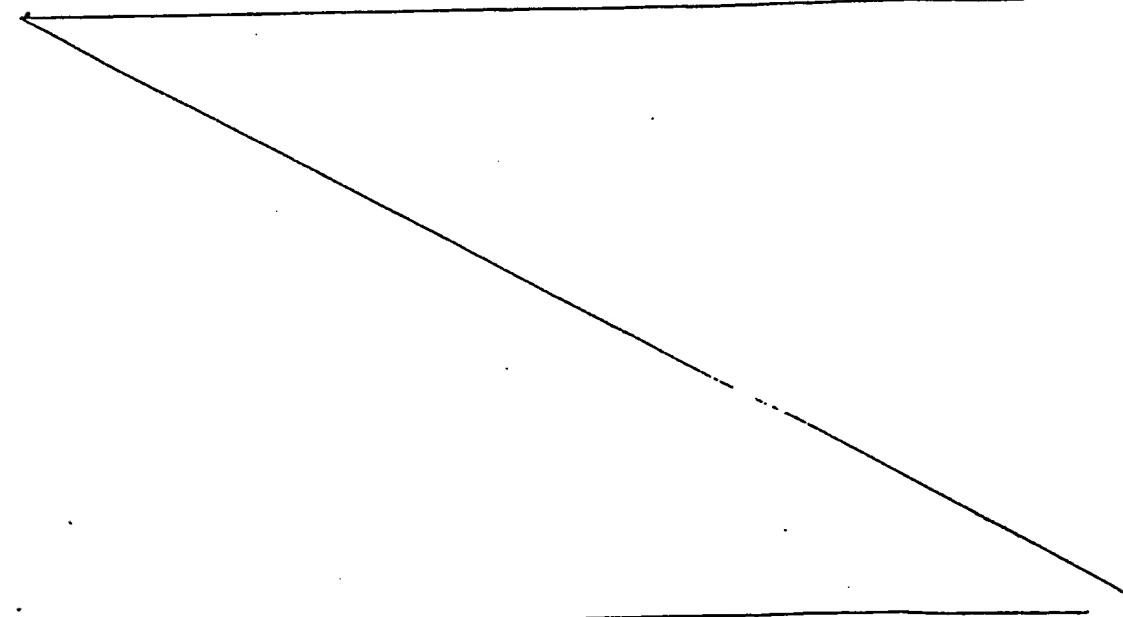


Tabelle IDurch Liposome hervorgerufene Aufnahme von 32 P-DNA durch HELA-Zellen im exponentiellen Wachstum

Liposome	32 P-DNA Gesamtauf- nahme	32 P-DNA Aufnahme im Kernextrakt (CPM)	Kernaufnahme als % der gesamten Aufnahme
<u>A. Endozytose</u>			
P.C.	1064	418	39
PC-Cytochalasin B	192	58	
50 µg/ml			
<u>B. Endozytose + Fusion</u>			
PC - PS (9 : 1)	860	240	
PC - PS + Cytochalasin B	550	140	25
50 µg/ml			

Mechanismus des Eintritts der PC-PS Liposome: ~36 % Endozytose

Effizienz der Kernaufnahme A) Endozytose ~39 %
B) Fusion ~25 %

- 10 -

Tabelle II

Menge von β -Lactamase, produziert von 10^7 HeLa-Zellen als Funktion der Liposomeneinführungsmethode

Liposome	Typ der Aufnahme	Behandlung	β -Lactamase ng/ml Zelleextrakt
5 PC	Endozytose	keine	200
PC	Endozytose- gehindert	Cytochalasin B	33
10 PC-PS	36 % Endozytose 64 % Fusion	keine	100

Tabelle II zeigt die relative Produktivität der Hela-Zellen für β -Lactamase, wenn das Gen über verschiedene Liposomen-aufnahmemechanismen eingeschleust wurde.

Synchronisierung der Zellen

15 Die Zellen wurden in der Mitose (M) und in der G₁-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Die verschiedenen Einbauniveaus in den Zellkernen sind in der Tabelle III gezeigt. Obwohl die zelluläre Aufnahme von Endozytose-Liposomen in den mitotischen Zellen abnimmt, werden 72 - 75 % der eingebauten DNS-Moleküle in der chromosomalnen DNS gefunden. Wenn die Liposome überwiegend durch Fusion aufgenommen werden, findet man etwa 40 % der inkorporierten DNS-Moleküle in der chromosomalnen DNS der Zelle. Exponentiell wachsende Zellen und G₁-synchronisierte Zellen unterscheiden sich in ihrer Kern-20 aufnahmefähigkeit nur geringfügig. Überraschend ist, daß die DNS-Aufnahme durch die Fusion mit Liposomen recht hoch in der 25 Mitose ist, in der chromosomalnen DNS findet man aber nur

- 11 -

46 % dieser DNS. Mit Endozytose-Liposomen findet man dagegen 72 % der eingebauten DNS in der chromosomalen DNS der Zelle. Dieses zeigt, daß die Lipid-Doppelschicht der Endozytose-Liposomen die DNS auf ihrem Weg zum Kern mindestens eine 5 Zeitlang schützt, während mit Fusion-Liposomen die aufgenommene DNS von Anfang an der Wirkung der zytoplasmatischen DNasen ausgesetzt ist. Diese Ergebnisse wurden mit einer Reihe von Genen erhalten und haben sich als allgemein gültig mit sehr unterschiedlichen eukaryoten Zellen erwiesen.

- 12 -

Tabelle III

Art der Liposome	Zelltyp	Einbau i.d.Zellen	Einbau i.d.Kern	% der Kernfraktion
PC	Mitose	3514	2547	72
	G ₁	4868	1829	37
	exponentiell wachsende Zellen	3532	1736	49
PC/PS	Mitose	6454	2977	46
	G ₁	4100	1660	40
	exponentiell wachsende Zellen	3560	1862	52

Beispiel 2Die c-DNA des Lysozyms

Die c-DNA des Lysozyms wurde in dem Plasmid pBR 322 an die PST I Schnittstelle eingebaut. Das Gen wurde in Injektionsliposome eingeschlossen.

Einschluß des Gens in Liposome

10 μ M Eiphosphatidylcholin (Endozytoseliposome) oder eines Gemischtes PC : PS (Phosphatidylserin) im molaren Verhältnis 9 : 1 wurden in Äther gelöst. Sie wurden mit Hilfe einer 10 Hamiltonspritze in einer auf 60°C erwärmten Lösung des Gens (2 μ g) in His-Tris-Puffer injiziert. Der Äther verdampft und die Lipide bilden große Vesikeln, welche die gelöste DNS einschließen. Die Endozytose- und die Fusionsliposome wurden mit Hela-Zellen inkubiert. Die zelluläre DNS wurde wie vorher 15 isoliert und das radioaktive Gen gezählt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle IV enthalten. Die Expression gemessen als enzymatische Aktivität des Lysozyms erfolgte auch wie im Beispiel 1, zusätzlich mit Hilfe der Nothern-Methode (J.C. Alwine, D.J. Kemp, G.R. Stark, Proc. 20 Natl. Acid. Sci. US 74, 5350, 1977) die Zahl der synthetisierten Lysozym-m-RNS Moleküle in den Zellen bestimmt, die das Lysozym-Gen inkorporiert hatten.

- 14 -

Tabelle IV

Einbau der Lysozym c.DNS in Hela-Zellen

Art der Liposomen 5	Zelltyp	Einbau in Zellen	Einbau in die Kern DNS	% in der Kernfrak- tion
PC (Endozy- tose)	Mitose Expr.	2808 3640	2150 1728	76 41
PC-PC (Fusion)	Mitose Expr.	5410 4080	2480 1936	46 40

10 Bei Verwendung von Endozytose-Liposomen wurden 300 Moleküle Lysozym-m-RNS/Zelle gefunden; bei Verwendung von Fusionliposomen wurden in den Hela-Zellen je 180 Moleküle m RNS (Lysozym) pro Zelle produziert.
 15 Die Effizienz des Einbaus mit Endozytose-Liposomen erweist sich noch einmal. Wiederum sind die Endozytose-Liposome am wirksamsten, wenn die Zellen in der Mitose arretiert (synchronisiert) worden sind.

Beispiel 3Das Kaninchen β -Globin Gen in pRB 322 Plasmid

Dieses Gen wurde, wie in Beispiel 2, in Injektions-Liposome eingebaut. Die Liposome aus Eiphosphatidylcholin (PC, Endozytose) oder aus PC-PS (9 : 1, Fusion). Die Hela-Zellen

- 15 -

wurden synchronisiert, wie oben beschrieben. Die Einbauergebnisse sind in der Tabelle V dargestellt. Das Gen wurde mit ^3H markiert und die Radioaktivität in den Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen Typen von Liposomen gemessen. Nach Isolierung der Kern-DNS wurde in dieser Fraktion auch die Radioaktivität gemessen.

Tabelle V

Einbau des β -Globin-Gens in Hela-Zellen

Art der Liposome	Zelltyp	Einbau in Zellen	Einbau in der Kernfraktion	%
PC	Mitose	2654	2055	77
(Endozytose)	Exp.	3452	1681	49
PC-PS	Mitose	5380	2445	46
(Fusion)	Exp.	4050	1950	47

Man kann sehen, daß auch in diesem Fall der höchste Einbau in der Kernfraktion durch Verwendung der Endozytose-Liposome erreicht wird. Wenn die Zellen aber in der Mitose synchronisiert (arretiert) werden, kann die Wirksamkeit des

Einbaus mit Endozytose-Liposomen wesentlich noch erhöht werden. Die Expression des Gens, als Zahl der Globin m-RNS Moleküle/Zelle gemessen, zeigt das gleiche Bild wie im Beispiel 2.

Beispiele 4 - 10

5 Unter Verwendung der auf Seiten 1 und 2 unter 4.) bis 10.) genannten Gene und Durchführung der Reaktionen in der in Beispielen 1 - 3 beschriebenen Weise werden ähnliche Ergebnisse erzielt.
Diese Erfindung zeigt, daß es überraschenderweise möglich
10 ist, mit Hilfe von Endozytose-Liposomen in Mitose-Zellen wesentlich höhere Kopienzahl von Genen einzubauen und zur Expression zu bringen. Die Bestimmung der Zahl der m-RNS-Moleküle, die dadurch gebildet werden, sowie der Protein-Synthese, die anschließend erfolgt, zeigen, daß dieses Ver-
15 fahren zur Produktion von größeren Proteinmengen geeignet ist. Es muß hinzugefügt werden, daß die synthetisierten Proteine identisch sind mit den natürlichen Produkten dieser Gene, was für die potentielle biologische Wirkung dieser Proteine wichtig ist.
20 Durch die Erfindung sind die folgenden Anwendungen und gewerblichen Verwertbarkeiten gegeben:
1.) Eine einfache, leicht standardisierbare Methode zum Einbau von pro- und eukaryotischen Genen jedwelcher Dimension in eukaryote Zellen, z.B. Einschluß von ganzen Plasmid DNS ($MG > 20 \times 10^6 \text{ } \mu$) in Fusions- u. Endozytose-Liposomen.
25 2.) Die Herbeiführung einer dauerhaften genetischen Veränderung in Eukaryoten-Zellen, die zur ständigen Produktion des gewünschten Proteins führen.
30 3.) Eine verbesserte Aufnahme des Genmaterials in die Kernfraktionen der Zellen durch Einschleusung dieses Materials in die Zellen mit Hilfe von Endozytose-Liposomen.

- 4.) Eine verbesserte Aufnahme des Genmaterials durch Endozytose von Gen-beladenen Liposomen durch Mitose-Zellen.
- 5.) Eine Dosierung des Genproduktes in den eukaryoten Zellen durch Einbau zunehmender Genkopien mit Hilfe von Endozytose-Liposome (oder Fusion-Liposome) in synchronisierten aber auch exponentiell wachsenden Zellen.
- 10 6.) Kombination von synchronisierten Zellen in der Mitose mit DNS beladenen Endozytose-Liposomen zwecks Erreichung der höchsten Proteinproduktion durch die so transformierten Zellen.
- 15 7.) Verwendung von Endozytose- (oder auch Fusions-) Liposome, mit DNS beladene, zwecks Einschleusung von Genen in Zellen und Organe lebender Organismen in vivo. Die beispielweise infrage kommenden Gene sind:
β-Globulin, α-Globulin, Insulin, Leberhydrogenase, das Gen für die Synthese der Phenylhydroxylase, Interferon, Gene für Immunoglobulin, etc.

P a t e n t a n s p r ü c h e

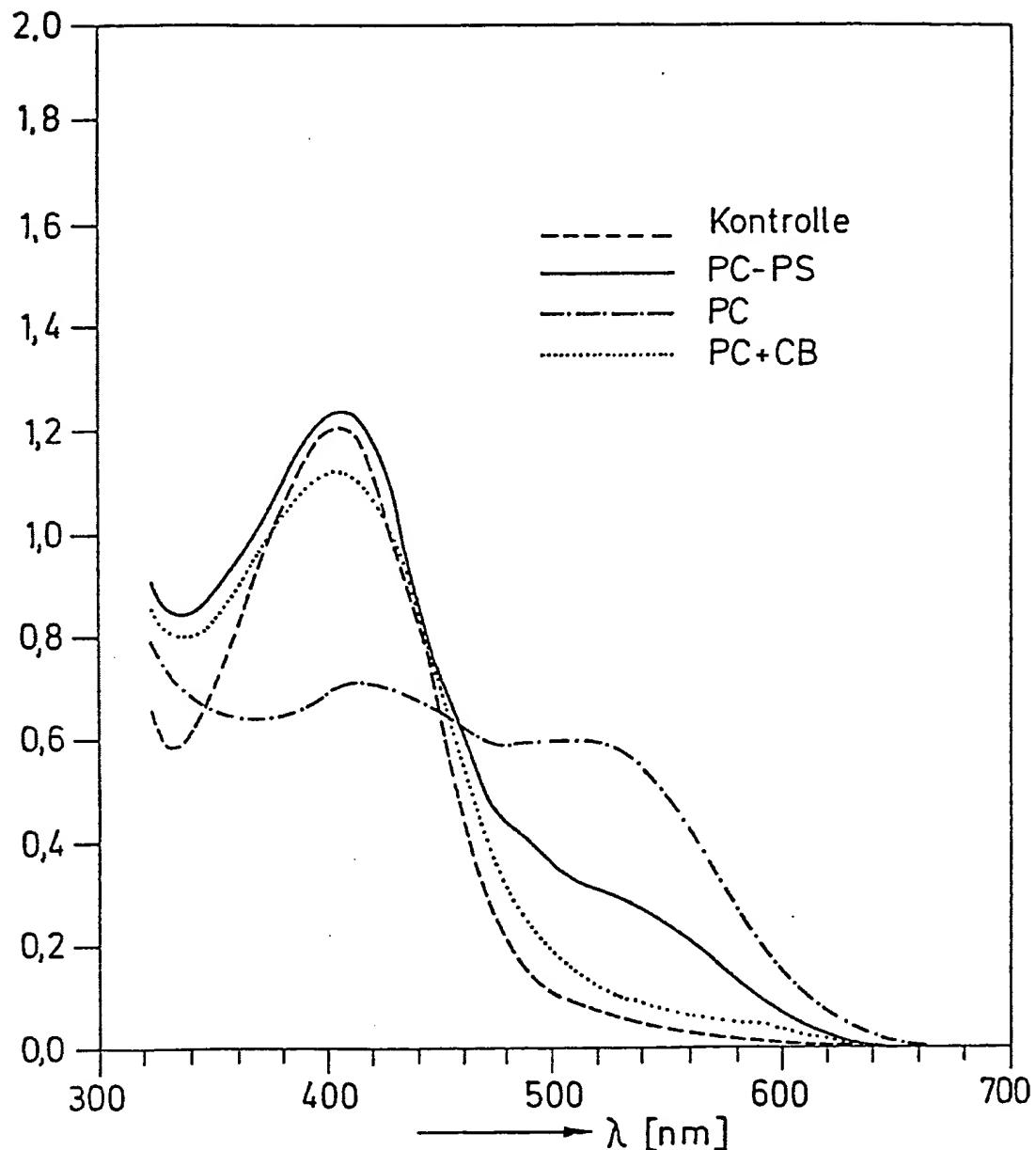
1. Verfahren zur Erhöhung der Aufnahme und der Expression von genetischem Material in die Kerne von intakten Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man mit genetischem Material beladene Endozytose-Liposome durch Endozytose in die Zellkerne einführt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich mit genetischem Material beladene Fusions-Liposome durch Fusion in die Zellkerne einführt.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als genetisches Material DNS-Moleküle verwendet.
4. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als genetisches Material bla-Gen, Restriktionsfragmente des bla-Gens aus dem Plasmid pBR 322 E. coli, das gesamte pBR 322 E.coli Plasmid, das Kaninchen β -Globin-Gen in pBR 322 Plasmid, die Lysozym C-DNA im gesamten pBR 322 Plasmid, das Conalbumin-Gen im pBR 322 Plasmid, das Thymidinkinase-Gen im pBR 322 Plasmid, das SV 40-Virus, das genomiale Interferongen in pBR 322 Plasmid, die c-DNA des Interferons im Plasmid und das Insulin-Gen im Plasmid pBR 322 verwendet.
5. Verfahren nach Ansprüchen 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die mit genetischem Material beladenen Endozytose-Liposome in synchronisierte mitotische Zellen einführt.

0043075

-1/2-

FIG.1

Expression der bla-Gene in HeLa-Zellen



0043075

-212-

